

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 808**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09757269 .7**
96 Fecha de presentación: **02.06.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2297195**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2011**

54 Título: **Péptidos antibacterianos**

30 Prioridad:
02.06.2008 US 58010 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
Spiderbiotech S.r.l.
Bioindustry Park del Canavese Via Ribes 5
10010 Colletterto Giacosa, IT

72 Inventor/es:
GIULIANI, Andrea;
PIRRI, Giovanna y
FABIOLE NICOLETTO, Silvia

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 377 808 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos antibacterianos

5 La presente invención se refiere a compuestos peptídicos monoméricos y multiméricos que tienen actividad antimicrobiana, particularmente frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Adicionalmente, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden dichos compuestos peptídicos para uso médico, para uso como un desinfectante y/o detergente, o para uso como un conservante.

10 La mayor aparición de microorganismos multirresistentes ha alentado un renovado interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. La motivación para producir agentes más nuevos que seleccionen como dianas a nuevos sitios que puedan evitar la resistencia es crítica para el control a largo plazo de la infección bacteriana (Ref. 1).

15 La industria farmacéutica ha satisfecho previamente esta necesidad modificando antibióticos existentes y desarrollando nuevos antibióticos de una manera puntual. Los esfuerzos exitosos han producido la amplia variedad de clases farmacéuticas de antibióticos actualmente disponibles: beta-lactamas (penicilinas, carbapenems, cefalosporinas), glucopéptidos, macrólidos, cetólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, oxazolidinonas, y otros (Ref. 2). Sin embargo, recientemente se han detectado microorganismos que son resistentes frente a la mayoría o todas las clases conocidas de antibióticos. De este modo, hay una mayor necesidad de nuevos compuestos antibióticos.

20 Los péptidos antimicrobianos son componentes del sistema inmunitario no específico que representan una clase prometedora de agentes antiinfecciosos. Aunque su modo de acción no está bien comprendido, se cree que tienen múltiples dianas, incluyendo la membrana citoplásmica y los procesos de división celular y síntesis macromolecular (Ref. 3).

25 R.E.W. Hancock ha publicado una revisión de los antibióticos peptídicos (Ref. 4). La revisión se centra principalmente en las ventajas y desventajas de péptidos antimicrobianos (AMPs) catiónicos cuando se comparan con antibióticos convencionales, y resume los desarrollos clínicos recientes con estos péptidos. Se pueden definir como cortos (10-50 aminoácidos), con una carga global positiva (generalmente +2 a +9) y una porción sustancial ($\geq 30\%$ o más) de restos hidrófobos. Estas propiedades permiten al péptido plegarse en una estructura anfifílica en tres dimensiones, a menudo al entrar en contacto con membranas, de manera que forman parches ricos en aminoácidos hidrófobos y cargados positivamente.

30 Los AMPs muestran un amplio espectro de actividad exterminadora *in vitro* frente a diversas dianas, tales como bacterias, hongos, virus encapsulados, parásitos, e incluso células tumorales (Ref. 5 y 6).

35 En los últimos 15 años, se han identificado casi 900 AMPs a lo largo de las especies, y ahora se reconocen como componentes esenciales del sistema inmunitario innato (Ref. 7). Las magaininas, por ejemplo magainina 2 y PGLa, están entre los AMPs mejor estudiados. Son péptidos lineales que se aislaron originalmente de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*. Las magaininas son ionóforos de hélice α que poseen dos actividades importantes: un amplio espectro antimicrobiano y una actividad antiendotoxínica (Ref. 8).

Una gran familia de AMPs en mamíferos está representada por catelicidinas. Son AMPs que poseen un dominio inhibidor de catepsina L aminoterminal (catelina). El dominio de 37 aminoácidos C-terminal de la única catelicidina humana h-CAP 18, LL-37, es un péptido helicoidal anfipático que ejerce una amplia actividad antimicrobiana (Ref. 9).

40 Se han ensayado *in vitro* e *in vivo* diversos péptidos sintéticos. Por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. nº 60/651.270 describe hexapéptidos antimicrobianos y sus lipoderivados, activos frente a un intervalo de patógenos. Estos péptidos son particularmente efectivos en el tratamiento de enfermedades fúngicas y bacterianas en mamíferos, y demuestran un potencial para promover la actividad bactericida de antibióticos convencionales, tales como polimixina B, frente a bacterias multirresistentes.

45 El documento WO 2006/006195 describe péptidos antibacterianos, es decir, un péptido que tiene la secuencia QKKIRVRLSA (SEC ID NO: 1). Aunque estos péptidos muestran actividad antimicrobiana, también son inestables para uso práctico. De hecho, la Gln N-terminal proporciona derivados piroglutámicos, cuyo contenido aumenta durante el almacenamiento del producto.

La presente invención proporciona métodos para usar y obtener nuevos compuestos peptídicos antimicrobianos para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas.

50 Estos nuevos compuestos peptídicos se identificaron mediante un proceso de barrido de secuencias y una etapa de alargamiento en un decapeptido lineal. La síntesis peptídica, llevada a cabo en fase sólida mediante química de Fmoc/tBu, permitió aislar librerías de péptidos que tienen una mayor actividad antibacteriana cuando se comparan con la secuencia original SEC ID NO 1 como se describe en el documento WO 2006/006195.

Una materia objeto de la presente invención es un compuesto peptídico que tiene una longitud de hasta 35 restos de aminoácidos, que comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula general (Ib):



5 en la que K es un resto de aminoácido con una cadena lateral de lisina, particularmente L- o D-lisina, u otro resto de aminoácido con una cadena lateral cargada positivamente,

I es un resto de aminoácido con una cadena lateral de isoleucina, particularmente L- o D-isoleucina,

R es un resto de aminoácido con una cadena lateral de arginina o una cadena lateral de guanidina *N*-alquil sustituida, particularmente L- o D-arginina,

V es un resto de aminoácido con una cadena lateral de valina, particularmente L- o D-valina,

10 en la que uno de los restos de aminoácidos K, I, R, y V se puede sustituir por un resto de aminoácido con una cadena lateral de alanina, particularmente L- o D-alanina,

A es un resto de aminoácido con una cadena lateral de alanina, particularmente L-alanina,

S es un resto de aminoácido con una cadena lateral de serina, particularmente L-serina,

L es un resto de aminoácido con una cadena lateral de leucina, particularmente L-leucina, y

15 en la que uno o más de los restos de aminoácidos K, I, R, L, V y S se pueden sustituir por un resto de aminoácido con una cadena lateral de alanina,

Z es el grupo N-terminal del compuesto peptídico, que comprende al menos un resto aminoácido, y se selecciona de

20 (i) un resto de aminoácido aromático o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un resto de aminoácido aromático, en el que el resto de aminoácido aromático se selecciona particularmente de triptófano, *N*-metilriptófano, fenilalanina, β -fenilalanina, naftilalanina, β -naftilalanina, β -difenilalanina, β -(4,4'-bifenil)alanina, β -antracen-9-ilalanina y β -indol-3-ilalanina, o sus derivados sustituidos,

25 (ii) un resto de aminoácido alifático o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un resto de aminoácido alifático, en el que el resto alifático se selecciona particularmente de restos de α -aminoácidos que comprenden una cadena lateral alifática, preferiblemente una cadena lateral alifática ramificada de al menos 3 átomos de carbono,

(iii) un resto de ácido piroglutámico (pyrE) o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende un resto de aminoácido piroglutámico N-terminal,

30 (iv) un resto Q* o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende un resto Q* N-terminal,

en el que Q* es un resto de aminoácido protegido con una cadena lateral glutamínica, particularmente un resto de L-glutamina protegido, y

(v) combinaciones de uno cualquiera de (i)-(iv), por ejemplo (i) y (iii), (i) y (iv), (ii) o (iii) y (ii) o (iv),

y n es 0 ó 1.

35 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un compuesto multimérico que comprende una pluralidad de compuestos peptídicos como se define anteriormente, en el que los compuestos peptídicos individuales están enlazados covalentemente, por ejemplo mediante restos multifuncionales, por ejemplo di- o trifuncionales, tales como aminoácidos di- o trifuncionales.

40 La presente invención se refiere a compuestos peptídicos. La expresión "compuestos peptídicos" engloba compuestos que comprenden al menos parcialmente bloques de construcción de aminoácidos o sus análogos, que están enlazados mediante enlaces covalentes, preferiblemente enlaces carboxamídicos. Los bloques de construcción se seleccionan preferiblemente de ácidos aminocarboxílicos, por ejemplo ácidos α -aminocarboxílicos, u otros tipos de ácidos carboxílicos, por ejemplo ácidos β - o incluso ω -aminocarboxílicos. Los bloques de construcción de aminoácidos se pueden seleccionar de ácidos L- α -aminocarboxílicos codificados genéticamente y/o sus enantiómeros D, y/o de bloques de construcción de aminoácidos de origen no natural. Los bloques de construcción individuales de los compuestos peptídicos están enlazados mediante enlaces covalentes, por ejemplo enlaces carboxamídicos, de carbamato, de éster y de tioéster. Los compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser lineales o cíclicos. Los compuestos peptídicos monoméricos tienen una longitud de hasta 35 restos de

aminoácidos, y preferiblemente una longitud de al menos 8, más preferiblemente al menos 10, y hasta 15 bloques de construcción de aminoácidos.

5 En una realización, los compuestos peptídicos de la invención comprenden un grupo Z N-terminal que comprende un resto de aminoácido aromático, preferiblemente un resto de α -aminoácido que comprende al menos un anillo aromático mono- o policíclico, preferiblemente al menos un anillo aromático bi- o tricíclico, por ejemplo fenilo, naftilo, antraceno, difenilo, indolilo, etc., o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un bloque de construcción de aminoácido aromático como se describe anteriormente.

10 Los ejemplos específicos para restos de aminoácidos aromáticos son triptófano, *N*-metiltriptófano, fenilalanina, β -fenilalanina, naftilalanina, β -naftilalanina, β -difenilalanina, β -(4,4'-bifenil)alanina, β -antraceno-9-ilalanina y β -indol-3-ilalanina, o sus derivados sustituidos, por ejemplo mono- o polialquil sustituidos. Más preferiblemente, el resto de aminoácido aromático comprende una cadena lateral de triptófano (W), por ejemplo L (o D)-triptófano.

15 En una realización adicional, los compuestos peptídicos de la invención comprenden un grupo Z N-terminal que comprende un resto de aminoácido alifático, preferiblemente un resto de α -aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, más preferiblemente una cadena lateral alifática ramificada de al menos tres átomos de carbono, por ejemplo 3, 4, 5, 6 ó 7 átomos de carbono, o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un bloque de construcción de aminoácido alifático como se describe anteriormente. Los ejemplos específicos para restos de aminoácidos alifáticos son derivados alquílicos ramificados, por ejemplo metílicos, de ácido 2-aminopentanoico, ácido 2-aminohexanoico o ácido 2-aminoheptanoico, o sus formas enantioméricas L o D. Más preferiblemente, el resto de aminoácido alifático comprende una cadena lateral de leucina (L), por ejemplo L-leucina.

20 En una realización adicional de la invención, el compuesto peptídico comprende un grupo N-terminal que es un resto de ácido piroglutámico (pyrE), o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende un resto de ácido piroglutámico N-terminal.

25 En todavía una realización adicional de la presente invención, el compuesto peptídico comprende un grupo N-terminal, que es un resto Q*, en el que Q* es un resto de aminoácido protegido con una cadena lateral de glutamina, particularmente L-glutamina protegida, o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende un resto Q* N-terminal para un derivado del mismo. Los ejemplos preferidos de restos Q* son restos dipeptídicos X-Q, en los que X es un resto de aminoácido diferente de Q, tal como G (glicina), o un resto Q, en los que el aminoácido N-terminal y/o el grupo de cadena lateral carboxílica está protegido, por ejemplo mediante acilo, tal como grupos acetilo, grupos amino, etc.

30 En todavía una realización adicional, el compuesto peptídico de la presente invención comprende una combinación de un resto de aminoácido aromático y un resto de ácido piroglutámico N-terminal, o una combinación de un resto de aminoácido aromático y un resto Q* N-terminal.

35 En una realización especialmente preferida, el grupo Z N-terminal del compuesto peptídico se selecciona de Ar, Ar-Q, Q* tal como G-Q o acetilo-Q, Q*-Ar tal como G-Q-Ar o acetilo-Q-Ar, pyrE y pyrE-Ar, en los que Ar es un resto de aminoácido aromático como se define anteriormente.

Los ejemplos específicos de compuestos peptídicos según la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

	WKKIRVRLSA	(SEC ID NO: 6)
	pyrEWKIRVRLSA	(SEC ID NO: 27)
40	GQWKIRVRLSA	(SEC ID NO: 14)
	Acetil-QWKIRVRLSA	(SEC ID NO: 12)
	Aoa-QWKIRVRLSA	(SEC ID NO: 16)
	(GQWKIRVRLSA) ₂ K- β -Ala	(SEC ID NO: 19)

45 en las que pyrE es un resto de ácido piroglutámico, Aoa es un resto de ácido 8-aminooctanoico, β -Ala es un resto de β -alanina, y en los que los péptidos anteriores están opcionalmente amidados en sus términos C.

50 En una realización preferida, la invención se refiere a un compuesto multimérico que comprende una pluralidad de compuestos peptídicos como se describe anteriormente. Por ejemplo, un compuesto multimérico de la presente invención puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de los compuestos peptídicos. El compuesto multimérico puede comprender los compuestos peptídicos multimerizados en una matriz, por ejemplo una matriz a base de un polipéptido, un mono-, oligo- o polisacárido, o un polímero orgánico, preferiblemente un polímero orgánico lineal. Por ejemplo, la matriz se puede seleccionar de poli(*N*-alquil(met)acrilamida), poli(*N,N*-dialquil(met)acrilamida), polimelamina, dextrano, ciclodextrina, polietilenglicol y/o polivinilpirrolidona. El acoplamiento de los compuestos

peptídicos a la matriz se produce preferiblemente vía los términos N y/o C del compuesto peptídico, por ejemplo usando ligadores homo- y/o hetero-bifuncionales que permiten el acoplamiento a grupos reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, tiol o carboxilo en la matriz.

5 En una realización preferida adicional, el compuesto multimérico tiene una estructura ramificada, particularmente una estructura dendrímica.

En todavía una realización adicional, el compuesto multimérico se selecciona de:



10 en el que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, Y^1 es un enlace covalente o un ligador bifuncional, por ejemplo un dialcohol tal como propilenglicol, un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, una diamina tal como etilendiamina, un aminoácido, un ácido hidroxicarboxílico, por ejemplo un ácido hidroxialcanoico, o un diisocianato, y m es 0 o un número entero positivo, y m' es 0 ó 1,

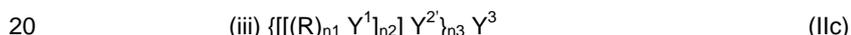


en la que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

15 Y^1 es, en cada caso, independientemente, un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 3, por ejemplo un aminoácido trifuncional tal como lisina, ornitina, norlisina, aminoalanina, ácido aspártico o ácido glutámico, y

Y^2 es un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 2, y

n_1 y n_2 son, en cada caso, independientemente, un número entero de al menos 2, preferiblemente 2, 3 ó 4, más preferiblemente 2,



en la que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

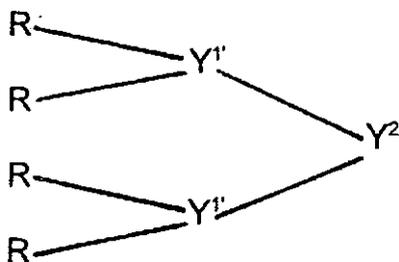
Y^1 e Y^2 son, en cada caso, ligadores independientes que tienen una funcionalidad de al menos 3, por ejemplo un aminoácido trifuncional tal como lisina, ornitina, norlisina, aminoalanina, ácido aspártico o ácido glutámico,

Y^3 es un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 2, y

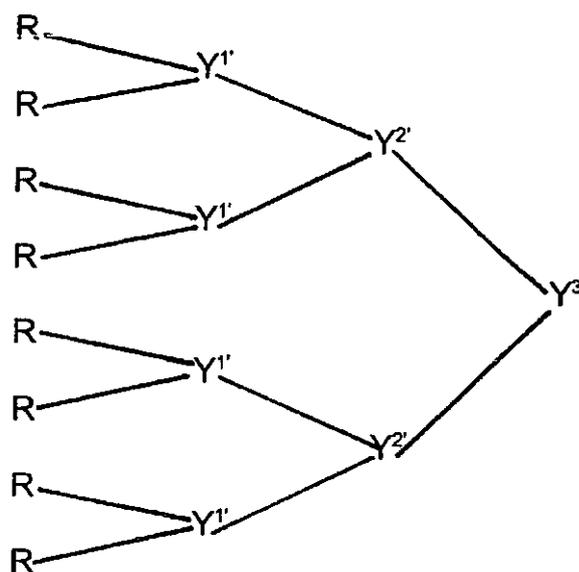
25 n_1 , n_2 y n_3 son, en cada caso, independientemente, números enteros de al menos 2, preferiblemente 2, 3 ó 4, más preferiblemente 2.

El compuesto multimérico (IIa) es un compuesto lineal multimérico, en el que una pluralidad de compuestos peptídicos están conectados vía enlaces covalentes y/o ligadores homo- o hetero-bifuncionales Y^1 . Preferiblemente, el compuesto multimérico comprende hasta 8, más preferiblemente hasta 4 unidades de compuesto peptídico (Ib).

30 Los compuestos multiméricos (IIb) y (IIc) son compuestos ramificados, en los que las unidades peptídicas individuales R están conectadas vía ligadores que tienen una funcionalidad de al menos 3. En una realización preferida, el compuesto multimérico (IIb) comprende 4 unidades peptídicas, y tiene la estructura:



35 En una realización preferida adicional, el compuesto multimérico (IIc) comprende 8 unidades peptídicas, y tiene una estructura:



En todavía una realización adicional de la presente invención, los compuestos peptídicos y multiméricos comprenden al menos una modificación, particularmente seleccionada de un resto lipídico, amídico, de éster, acílico y/o alquílico unido a los mismos, por ejemplo unido a un grupo N-terminal, un grupo C-terminal y/o un grupo de cadena lateral. Se prefieren las modificaciones N- y/o C-terminales.

Una modificación especialmente preferida es la unión de al menos un resto lipídico, que es al menos un ácido aminocarboxílico que comprende un grupo hidrocarbonado lineal o cíclico, saturado o mono- o poliinsaturado, que tiene 3 a 25, y preferiblemente 5 a 25 átomos de carbono, por ejemplo ácido 5-aminovalérico, ácido 8-aminooctanoico, o ácido 2-aminodecanoico. Preferiblemente, el resto lipídico está unido al término N y/o C del compuesto. Los restos lipídicos se pueden unir, por ejemplo, a términos N o C libres de compuestos peptídicos y/o compuestos multiméricos. Sin embargo, los restos lipídicos también se pueden unir a ligadores N- y/o C-terminales, por ejemplo como se describe para los compuestos (IIa), (IIb) y (IIc). En una realización preferida de compuestos (IIb) y (IIc), los ligadores C-terminales Y² e Y³ son ligadores trifuncionales a los que se puede unir un resto lipídico.

Una realización preferida adicional es la unión de grupos acílicos, por ejemplo acetilo, a los términos N, y/o la amidación de los términos C libres.

Los compuestos de la presente invención pueden tener actividad antimicrobiana, particularmente actividad frente a organismos patógenos seleccionados de organismos procariotas, por ejemplo eubacterias o arqueas, y organismos eucariotas, por ejemplo hongos, algas o parásitos. Preferiblemente, los compuestos tienen actividad antibacteriana, por ejemplo actividad frente a bacterias gramnegativas y/o grampositivas.

Los compuestos de la presente invención también pueden tener actividad anti-biopelícula. Están surgiendo con el tiempo infecciones relacionadas con la inserción de dispositivos médicos en el organismo. El proceso implica la adhesión del organismo sobre dispositivos, la multiplicación y la formación de biopelículas. Las biopelículas son difíciles de erradicar con agentes antimicrobianos convencionales, estando la resistencia antimicrobiana determinada por alguna peculiaridad del crecimiento de la biopelícula (Ref. 10). En consecuencia, en un aspecto adicional, los compuestos según la invención también se pueden usar para prevenir o inhibir el crecimiento y proliferación de bacterias embebidas en biopelículas, tales como, pero sin limitarse a: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Staphylococcus aureus*.

Una materia objeto adicional de la presente invención es una composición para uso médico que comprende al menos un compuesto como se define anteriormente por ejemplo un compuesto peptídico o multimérico como se define anteriormente, junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Para uso en medicina humana o veterinaria, la composición está preferiblemente en forma de una forma de dosificación farmacéutica seleccionada de sólidos, líquidos o geles, y sus combinaciones, por ejemplo como un colirio, colutorio, ungüento, aerosol o producto tópico. La forma de dosificación farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva del compuesto peptídico monomérico o multimérico de la invención, es decir, una cantidad del agente activo que es efectiva para el tratamiento y/o prevención de trastornos provocados por, asociados con o acompañados de la presencia de organismos patógenos. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea aquí para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, según sea el caso, un animal, sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, en proporción con una relación razonable de beneficio/riesgo.

La cantidad real del agente activo en la forma de dosificación farmacéutica de la invención puede variar dependiendo de la vía de administración y del tipo y gravedad de trastorno a tratar. Para lograr el efecto o efectos deseados, el compuesto peptídico monomérico o multimérico se puede administrar como una única dosis o como dosis divididas, por ejemplo, de al menos alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 200 a 550 mg/kg, de al menos alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 100 a 300 mg/kg, al menos alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 50 a 100 mg/kg, o al menos alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 10 a 50 mg/kg de peso corporal, o al menos alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, aunque otras dosis pueden proporcionar resultados beneficiosos.

Para preparar la composición farmacéutica, los péptidos de la invención se sintetizan o se obtienen de otro modo, se purifican según sea necesario o se desee, y después preferiblemente se liofilizan y se estabilizan. El péptido se puede ajustar entonces a la concentración adecuada y se puede combinar opcionalmente con los otros agentes farmacéuticamente aceptables.

De este modo, se puede administrar una o más formas de dosificación unitaria adecuadas que comprenden los péptidos terapéuticos de la invención mediante una variedad de vías, incluyendo las vías oral, tópica, parenteral (incluyendo la subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), vaginal, rectal, dérmica, transdérmica, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratoria).

Para administración tópica, los agentes activos se pueden formular como se conoce en la técnica para aplicación directa a un área diana, por ejemplo uñas y piel. Las formas principalmente acondicionadas para aplicación tópica toman la forma de, por ejemplo, lacas, cremas, leches, geles, polvos, dispersiones o microemulsiones, lociones espesadas en mayor o menor medida, almohadillas impregnadas, ungüentos o palitos, formulaciones en aerosol (por ejemplo pulverizaciones o espumas), jabones, detergentes, lociones o tortas de jabón. Otras formas convencionales para este fin incluyen gasas para heridas, vendajes revestidos u otros recubrimientos poliméricos, ungüentos, cremas, lociones.

En una realización preferida adicional, los compuestos monoméricos o multiméricos o la composición de la presente invención se usan en aplicaciones de medicina veterinaria. Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición veterinaria que comprende al menos un compuesto como se describe anteriormente.

Todavía una realización adicional de la presente invención se refiere a una composición para uso como un desinfectante y/o detergente, que comprende al menos un compuesto como se describe anteriormente, o para uso de un conservante, por ejemplo un conservante para productos médicos, cosméticos o alimentarios, que comprende al menos un compuesto descrito anteriormente.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una composición para disminuir el crecimiento o proliferación de microorganismos embebidos en biopelículas, que comprende al menos un compuesto como se describe anteriormente.

En todavía una realización adicional de la presente invención, los compuestos peptídicos y las composiciones se usan para tratar la superficie de un dispositivo, preferiblemente un dispositivo médico que es deseable que sea resistente a microorganismos. En particular, según este aspecto de la invención, los compuestos peptídicos y su composición se revisten sobre la superficie de un dispositivo médico, en particular uniendo, revistiendo y/o embebiendo los compuestos y composiciones de la invención en un dispositivo médico. Los ejemplos de dispositivos médicos incluyen tubos y cánulas, endoprótesis vasculares, instrumentos quirúrgicos, catéteres, marcapasos, válvulas protésicas de corazón, articulaciones protésicas, prótesis de la voz, lentes de contacto, y dispositivos intrauterinos.

Adicionalmente, la presente invención se explicará con más detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos:

La Figura 1 muestra una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meyer de los ensayos in vivo de eficiencia, en los que el compuesto peptídico dimérico ID24 (SEC ID NO:24, véase Tabla 4) de la invención se compara con el compuesto antibiótico de referencia colistin metanosulfonato de sodio (CMS) al mismo régimen de dosis en un modelo de septicemia en ratones.

La Figura 2a y la Figura 2b muestran dos gráficas de histogramas, en las que se da a conocer la exposición de una biopelícula de 24 horas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a diferentes concentraciones del compuesto peptídico dimérico ID24 y el compuesto antibiótico de referencia CMS, respectivamente.

En particular, la Figura 2a muestra la exposición de la biopelícula de 24 horas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a diferentes concentraciones del compuesto ID24 de la invención. El número de réplicas/concentración es $n = 2$.

En particular, la Figura 2b, por otro lado, muestra la exposición de la biopelícula de 24 horas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a diferentes concentraciones de la colistin metanosulfonato de sodio (CMS). El número de réplicas/concentración es $n = 2$.

EJEMPLOS

Materiales

Los disolventes, todos de grado HPLC, se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, US) y se usaron sin purificación adicional. La *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), la piperidina, el ácido trifluoroacético y el triisopropilsilano se adquirieron de Aldrich y Fluka (St. Louis, MO, US). Los Fmoc-aminoácidos, HOBT, HBTU y las resinas se suministraron de Chem-Impex International (Wooddale, Ill.) y Merck (Darmstadt, Alemania).

Síntesis peptídica. Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida en un MultiSynTech Syro (Witten, Alemania), usando química de Fmoc/*t*Bu. La activación del acoplamiento se llevó a cabo mediante HOBt/DIPEA/HBTU (1/2/0,9) en DMF, y la protección mediante Fmoc en la amina se eliminó empleando piperidina al 40% en NMP. Los grupos protectores de las cadenas laterales fueron: éster *tert*-butílico para Glu y Asp; tritilo para His, Gln y Asn; 2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para Arg; éter *tert*-butílico para Ser, Thr y Tyr; *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) para Lys, Pro y Trp. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH fue el aminoácido usado para sintetizar péptidos diméricos y tetraméricos. El ácido Fmoc-5-aminovalérico (5-Ava) y el ácido Fmoc-8-aminooctanoico (8-Aoa) se usaron para llevar a cabo la lipidación en el término N y/o C tanto en péptidos lineales como diméricos. Los péptidos tetraméricos, diméricos y lineales se prepararon en resina de 4-benzhidrilamina de amida de Rink (MBHA), evaluando mediante medidas espectrofotométricas la carga final en grupos amino libres, mientras que los péptidos ácidos se prepararon en una resina de cloruro de 2-clorotritilo. Todos los péptidos se escindieron de las resinas y se desprotegeron mediante tratamiento con ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (TIPS, 95:2.5:2,5). Los péptidos brutos, obtenidos mediante precipitación en éter dietílico, se purificaron mediante Waters HPLC-UV (Milford, MA) en una columna Phenomenex C₁₂, y se caracterizaron mediante espectrometría de MALDI-TOF de Bruker (Billerica, Massachusetts).

Determinación de MIC. Las MICs se determinaron en MHB mediante la metodología de microdilución en caldo, según el procedimiento de CLSI (antiguamente NCCLS, Ref. 11) usando inóculos bacterianos finales de 1-5 x 10⁵ CFU/ml. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con pocillos de fondo redondo (Corning Costar). Las placas se incubaron a 37°C y se leyeron después de 20-24 h. La MIC se definió como la concentración más baja de fármaco que provoca la supresión completa de crecimiento bacteriano visible. Todos los compuestos se disolvieron en 5% v/v de DMSO.

EJEMPLO I

Síntesis de minilibrería 2-X₁

La síntesis peptídica se llevó a cabo en una resina de cloruro de 2-clorotritilo, como se describe anteriormente. Se sintetizaron seis péptidos ácidos lineales, que tienen la secuencia general *H*-X₁-KKIRVRLSA-OH, con X₁ = F, I, L, V, W, Y, y se combinaron en cantidades equimolares. La mezcla peptídica bruta resultante se purificó en una columna de HPLC C₁₂ a fin de eliminar las sales y depuradores procedentes de la escisión, y se analizó mediante LC-MS (ESI/trampa de iones) acoplado a un sistema de HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), eluyendo los componentes con un modo de gradiente (B: 5 → 95% en 20 min.; A: 0,1% de TFA en agua, B: 0,1% de TFA en acetonitrilo) a un caudal de 1,0 ml/min. MS (LC-MS ESI/trampa de iones): (ID2) calculado para C₅₆H₁₀₀N₁₈O₁₂ (X₁=F) es (M) 1216, encontrado es 1217 (M+H); (ID3) calculado para C₅₃H₁₀₂N₁₈O₁₂ (X₁ = I) es (M) 1182, encontrado es 1183 (M+H); (ID4) calculado para C₅₃H₁₀₂N₁₈O₁₂ (X₁ = L) es (M) 1182, encontrado es 1183 (M+H); (ID5) calculado para C₅₂H₁₀₀N₁₈O₁₂ (X₁ = V) es (M) 1168, encontrado es 1169 (M+H); (ID6) calculado para C₅₈H₁₀₁N₁₉O₁₂ (X₁ = W) es (M) 1255, encontrado es 1256 (M+H); (ID7) calculado para C₅₆H₁₀₀N₁₈O₁₃ (X₁ = Y) es (M) 1232, encontrado es 1233 (M+H).

EJEMPLO II

Síntesis de minilibrería 3-X₁

La síntesis peptídica se llevó a cabo como se describe anteriormente. Se sintetizaron seis péptidos ácidos lineales, que tienen la secuencia general *H*-Q-X₁-KIRVRLSA-OH con X₁ = F, I, L, V, W, Y, y se combinaron en cantidades equimolares. La mezcla peptídica bruta se purificó como se da a conocer en el Ejemplo I. MS (LC-MS ESI/trampa de iones): (ID8) calculado para C₅₅H₉₆N₁₈O₁₃ (X₁ = F) es (M) 1216, encontrado es 1217 (M+H); (ID9) calculado para C₅₃H₁₀₁N₁₈O₁₃ (X₁ = I) es (M) 1197, encontrado es 1198 (M+H); (ID10) calculado para C₅₂H₉₈N₁₈O₁₃ (X₁ = L) es (M) 1182, encontrado es 1183 (M+H); (ID11) calculado para C₅₁H₉₆N₁₈O₁₃ (X₁ = V) es (M) 1168, encontrado es 1169 (M+H); (ID12) calculado para C₅₇H₉₇N₁₉O₁₃ (X₁ = W) es (M) 1255, encontrado es 1256 (M+H); (ID13) calculado para C₅₅H₉₆N₁₈O₁₄ (X₁ = Y) es (M) 1232, encontrado es 1233 (M+H).

EJEMPLO III

Síntesis de péptido ácido lineal: ID1, ID6 e ID14

La síntesis del péptido ácido se llevó a cabo como se describe anteriormente. Después de la síntesis, los péptidos brutos se purificaron mediante HPLC-UV mediante un gradiente B 5 → 95% en 20 min., y se caracterizaron

mediante MALDI-TOF. Los valores de las masas (M+H) fueron: (ID1) calculado es (M) 1197, encontrado es 1198 (M+H); (ID6) calculado es (M) 1255, encontrado es 1256 (M+H); (ID14) calculado es (M) 1383, encontrado es 1384 (M+H).

EJEMPLO IV

5 Síntesis de amidopéptido lineal *N*-acilado: ID15, ID16 e ID17

La síntesis del amidopéptido se llevó a cabo en una resina de amida de Rink, como se describe en el párrafo de Síntesis Peptídica. Después de la síntesis, los péptidos brutos se purificaron mediante HPLC-UV y se caracterizaron mediante MALDI-TOF, como se da a conocer en el Ejemplo I. Los valores de las masas (M+H) fueron: (ID15) calculado es (M) 1395, encontrado es 1397 (M+H); (ID16) calculado es (M) 1395, encontrado es 1397 (M+H); (ID17) calculado es (M) 1337, encontrado es 1339 (M+H).

EJEMPLO V

Síntesis de péptido dimérico: ID18, ID19 e ID20

La síntesis peptídica se llevó a cabo como se describe anteriormente. Tras la síntesis, los péptidos brutos se purificaron mediante HPLC-UV y se caracterizaron mediante MALDI-TOF, como se da a conocer en el Ejemplo I. Los valores de las masas (M+H) fueron: (ID18) calculado es (M) 2694, encontrado es 2696 (M+H); (ID19) calculado es (M) 2807, encontrado es 2808 (M+H); (ID20) calculado es (M) 2691, encontrado es 2692 (M+H).

EJEMPLO VI

Síntesis de péptido lipidado dimérico: ID21, ID22, ID23 e ID24

La síntesis peptídica se llevó a cabo como se describe anteriormente. Tras la síntesis, los péptidos brutos se purificaron mediante HPLC-UV y se caracterizaron mediante MALDI-TOF, como se da a conocer en el Ejemplo I. Los valores de las masas (M+H) fueron: (ID21) calculado es (M) 2891, encontrado es 2892 (M+H); (ID22) calculado es (M) 2891, encontrado es 2893 (M+H); (ID23) calculado es (M) 2859, encontrado es 2862 (M+H); (ID24) calculado es (M) 2763, encontrado es 2764 (M+H).

EJEMPLO VII

25 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Se hicieron crecer HeLa (estirpe celular de carcinoma epitelial humano), HepG2 (estirpe celular de carcinoma hepático hepatocelular humano) y HaCat (queratinocito humano) hasta confluencia, y después se cultivaron en placas a 20.000, 12.500 y 30.000 células por pocillo (previamente se había determinado el recuento celular óptimo para cada estirpe celular). Después de 24 horas, se añadió ID24 en DMEM sin FBS, a una concentración que oscila desde 800 a 100 ug/ml. Como controles positivos, también se añadieron 100 ul de células lavadas con medio sin suero que representan 100% de viabilidad, y, como negativos, 100 ul de medio sin suero.

Después de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% v/v, se añadieron a cada pocillo 10 ul de reactivo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrasodio, concentración final 0,5 mg/ml], y se incubó durante 2 a 4 horas. La solubilización de formazano, formado mediante reducción metabólica de MTT, se obtuvo usando la disolución de mezcla de parada (10% p/v de dodecilsulfato de sodio, 45% v/v de dimetilformamida, ajustada a pH 4,5 con ácido acético glacial). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (Biorad, Benchmark plus). Los cultivos expuestos a ID24 o expuestos al medio solo se midieron espectrofotométricamente a longitud de onda dual (565-650 nm). El experimento se llevó a cabo en tres réplicas.

EJEMPLO VIII

40 Hemólisis *in vitro*

La hemólisis se determinó mediante dos ensayos diferentes. Uno de ellos se adaptó del método de Shin et al. (Ref. 12), usando sólo eritrocitos humanos recientes. En el segundo, se incubó una disolución de ID24 en sangre completa.

Primer método

45 El ensayo de hemólisis se adaptó del método de Shin et al. (Ref. 12). Se usaron eritrocitos humanos recientes para ensayar las actividades hemolíticas de los péptidos. Se recogió sangre completa en un tubo estéril con una disolución al 4% p/v de citrato de sodio (en una relación 1:10 de citrato de sodio:sangre completa), se puso en hielo y se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante, que incluye los leucocitos encima del pelete de eritrocitos, se retiró con cuidado y se desechó. Los eritrocitos intactos se lavaron tres veces con 2 volúmenes (1 ml) de disolución salina libre de pirógenos preenfriada (PBS 1x). Las suspensiones de eritrocitos se ajustaron a 0,8% (8 ul en 1 ml o 160 ul en 20 ml) de PBS 1x.

5 Para el ensayo de hemólisis, se prepararon diluciones de dos veces en serie de ID24 en PBS 1x, y se añadieron alícuotas de 100 ul a volúmenes iguales de 0,8% de suspensión eritrocítica en PBS 1x en placas estériles de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 h.

10 Subsiguientemente, el eritrocito intacto se peletizó centrifugando a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. En consecuencia, se transfirieron cien microlitros de sobrenadante desde cada pocillo a una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos, y la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante se determinó leyendo la absorbancia a 414 nm frente a una longitud de onda de referencia de 490 nm. Un control positivo con 100 ul de 0,4% de eritrocito lisado en 1% de Triton X-100 en PBS 1x (200 ul de suspensión eritrocítica 0,8% en PBS 1x y 200 ul de PBS 1x con 2% (4 ul) de Triton X-100) se tomó como una lisis del 100%. El control negativo fueron eritrocitos en PBS 1x solo, que dio una lisis mínima. Esto se tomó como 0% de hemólisis

Segundo método

15 Se recogió sangre completa en un tubo estéril con una disolución al 4% p/v de citrato de sodio (en una relación 1:10 de citrato de sodio:sangre completa), y se conservó en hielo. Se añadieron diluciones en serie de ID24 (1 mg/ml a 62,5 ug/ml) a sangre completa en una relación 1:1 ó 1:10. El potencial hemolítico se expresó con relación a saponina, añadida en la misma relación, considerada como hemólisis del 100%. El control negativo fue sangre completa en disolución fisiológica, que dio una lisis mínima. Se añadieron alícuotas de 100 ul de cada suspensión en
20 placas estériles de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

25 Subsiguientemente, la suspensión se peletizó mediante centrifugación a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Cien microlitros de sobrenadante procedente de cada pocillo se transfirió en consecuencia a una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos, y la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante se determinó leyendo la absorbancia a 560 nm.

EJEMPLO IX

Eficacia *in vivo* en un modelo de septicemia en ratones

30 Se administró intravenosamente ID24 a ratones infectados intraperitonealmente con $7,5 \times 10^2$ CFU de *E. coli* EC47 en un volumen final de 0,5 ml. En particular, ID24 se administró a dosis de 3 mg/kg a 15 min. y 6 h después de la infección. Se administró colistin metanosulfonato de sodio (CMS) como una inyección única 15 min. después de la infección a una dosis de 3 mg/kg.

Animales

35 Se usaron ratones hembra ICR (Harlan Italy, San Pietro al Natisone, Italia) que pesan 25 g el día del experimento. Los ratones se enjaularon durante al menos 5 días en una habitación de temperatura y humedad controladas antes de comenzar el experimento, y se alimentaron con pienso estándar de laboratorio y agua *a voluntad*.

Compuestos de ensayo y de referencia

40 Los compuestos de ensayo y de referencia, ID24 y colistin metanosulfonato de sodio (CMS) respectivamente, se disolvieron en 0,1 M de disolución salina tamponada con fosfato pH 6,9, a las concentraciones de fármaco requeridas. Se obtuvieron disoluciones justo antes de la administración, y se almacenaron a 4°C hasta el final de los tratamientos programados. El valor de MIC de ID24 en la cepa EC47 de *E. coli* es 2 ug/ml [MIC se determinó mediante el método de microdilución en caldo en medio de Muller Hinton (directrices de NCCLS), usando un inóculo bacteriano de aproximadamente 10^5 CFU/ml].

Preparación de suspensión infectante

45 Para inocular 50 ml de caldo de infusión de cerebro-corazón de Difco, se usó un vial congelado de la cepa EC47 de *Escherichia coli*, el cultivo se incubó en un baño de agua agitador giratorio (New Brunswick Scientific, N.J., USA) durante 20 horas a 35°C, y después se diluyó 1:1.000.000 en 5% de mucina bacteriológica de Difco. El tamaño real del inóculo se determinó cultivando en placas dos alícuotas de 0,025 ml de disoluciones de 10 veces de la suspensión en placas de agar Difco Todd Hewitt.

50 A los animales se les infectó intraperitonealmente con $7,5 \times 10^2$ CFU de EC47 de *Escherichia coli* en un volumen final de 0,5 ml. Este inóculo fue suficiente para exterminar al 100% de los animales sin tratar en 72 h de infección.

Tratamiento antibiótico

Se administró ID24 a dosis de 3 mg/kg, a 15 min. y 6 h después de la infección. La dosis global es 6 mg/kg. Se administró colistin metanosulfonato de sodio (CMS) a una dosis, a saber, 3 mg/kg en una única inyección a 15 min. después de la infección.

- 5 El tratamiento se realizó mediante vía intravenosa (0,25 ml/ratón); se trataron ocho animales con cada dosis de cada antibiótico. La mortalidad se registró una vez al día durante 7 días tras la inoculación bacteriana.

EJEMPLO X

Procedimiento experimental de erradicación de biopelícula

- 10 Se vertió un inóculo de fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 de aproximadamente 1×10^7 CFU/ml en un depósito para reactivos de placas de Innovotech para el ensayo de alto rendimiento de MBEC TM (Innovotech Inc., Edmonton, Canadá). Se añadieron 22 ml de inóculo al pocillo, y se le colocó encima la tapa de peg. El dispositivo se colocó en una incubadora de agitación a 800 rpm en una caja humidificada a 37°C.

- 15 Después de 24 horas de incubación, los pegs se enjuagaron en una placa que contiene 200 ul de disolución fisiológica, para eliminar células planctónicas poco adherentes de la biopelícula, y después se colocaron en una microplaca que contiene 200 ul de diferentes disoluciones antibióticas diluidas en serie en TSB.

Después de 4 horas de contacto e incubación a 37°C en la incubadora de agitación, la tapa de peg se retiró del pocillo y se sumergió en una placa de enjuagado durante 2 minutos.

- 20 Después, un nuevo microtítulo con disolución salina que contiene los pegs de muestra se colocó en la bandeja del limpiador ultrasónico y se sometió a ultrasonidos durante 30 minutos para destruir la biopelícula de la superficie de los 96 pegs.

Se extendieron sobre la placa de MHA alícuotas duplicadas de 0,01 ó 0,005 ml de una dilución en serie de diez veces de cada pocillo, y las colonias se leyeron en busca de células viables contando después de 24 horas de incubación.

EJEMPLO XI

- 25 Toxicidad aguda *in vivo*

Animales

- 30 En el día del experimento, se usaron ratones hembra CD1 de 9-10 semanas (Charles River Lab. Italia s.r.l. Via Indipendenza, 11- 23885 Calco (LC), Italia), que pesan de media 28,23 g. Los ratones se enjaularon durante 3 días en una habitación de temperatura y humedad controladas antes de comenzar el experimento, y se alimentaron con pienso estándar de laboratorio y agua *a voluntad*

Compuesto de ensayo

Se disolvió ID24 y se sometió a ultrasonidos en disolución estéril de NaCl al 0,9% p/v (Sigma-Aldrich) para la administración a seres humanos a las concentraciones de dosis de 20 y 40 mg/kg. La preparación del compuesto se llevó a cabo justo antes de la administración.

- 35 Administración de antibiótico

Se administraron dos dosis de ID24 con una única inyección intraperitoneal a ratones: 20 mg/kg y 40 mg/kg. Se trataron cinco animales con cada dosis de antibiótico. Los síntomas adversos se monitorizaron diariamente durante 7 días después de la inyección.

Evaluación de resultados

- 40 Las supervivencias y los signos clínicos/de comportamiento se registraron diariamente durante 14 días.

Parámetros observados

Parámetros de comportamiento y signos clínicos principales proporcionados por el test de Irwin (Ref. 13).

La observación de todos los grupos después de una única inyección de la dosis nos permite resaltar los siguientes síntomas y alteraciones de comportamiento:

- 45 - 20 mg/kg: sin alteraciones de comportamiento;
- 40 mg/kg: sin alteraciones de comportamiento.

No se registraron síntomas adversos, ni alteraciones de comportamiento ni muertes tras la administración IP de ID24, también a la dosis más elevada de 40 mg/kg.

RESULTADOS

Construcción de minilibrerías y determinación de las MICS

- 5 El decapeptido lineal SEC ID NO 1 descrito en el documento WO 2006/006195 se optimizó en términos de actividad frente a bacterias gramnegativas. Este péptido fue activo cuando está presente como una estructura tetrámera en un núcleo de lisina. En forma monómera, el péptido sólo tuvo actividad insignificante. El enfoque de optimización consistió en la síntesis de nueve minilibrerías peptídicas, obtenidas mediante un barrido de secuencias como se da a conocer esquemáticamente en la Tabla 1.

10 Tabla 1. Las nueve librerías de barrido posicional decapeptídicas

Entrada de barrido*	Secuencia (A ₁ término N-A ₁₀ término C)
1-X _n	○ -A ₁ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
2-X _n	○ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
3-X _n	A ₁ -○ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
4-X _n	A ₁ -A ₂ -○ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
5-X _n	A ₁ -A ₂ -A ₃ -○ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
6-X _n	A ₁ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -○ -A ₆ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
7-X _n	A ₁ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -○ -A ₇ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
8-X _n	A ₁ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -○ -A ₈ -A ₉ -A ₁₀
9-X _n	A ₁ -A ₂ -A ₃ -A ₄ -A ₅ -A ₆ -A ₇ -○ -A ₉ -A ₁₀

*: X_n corresponde a un grupo de seis aminoácidos que contiene: Si n = 1, ○ = F, I, L, V, W, Y; si n = 2, ○ = K R, H, N, P, Q; Si n = 3, ○ = G, A, S, T, D, E.

- 15 Todos los aminoácidos naturales se han dividido en tres grupos basándose en sus propiedades quimicofísicas. Se obtuvo una cantidad total de 27 minilibrerías, conteniendo cada una seis péptidos en cantidades equimolares, y se evaluó frente a *E. coli* ATCC 25922 como cepa de referencia. Los valores de la actividad, expresados en términos de MIC, se dan en la Tabla 2. La MIC (Concentración Inhibidora Mínima) se define como la concentración más baja que inhibe el 100% de crecimiento visible.

Tabla 2. Las nueve minilibrerías de barrido posicional decapeptídicas: actividad de las 27 minilibrerías peptídicas resultantes frente a *E. coli* ATCC 25922

Entrada de barrido	MIC (ug/ml) <i>E. coli</i>	Entrada de barrido	MIC (ug/ml) <i>E. coli</i>	Entrada de barrido	MIC (ug/ml) <i>E. coli</i>
1-X ₁	125	4-X ₁	250	7-X ₁	125
1-X ₂	125	4-X ₂	250	7-X ₂	>250
1-X ₃	125	4-X ₃	>250	7-X ₃	>250
2-X ₁	62,5	5-X ₁	125	8-X ₁	62,5-125
2-X ₂	62,5	5-X ₂	>250	8-X ₂	250
2-X ₃	125	5-X ₃	>250	8-X ₃	250
3-X ₁	31,25-62,5	6-X ₁	125	9-X ₁	125
3-X ₂	250	6-X ₂	250	9-X ₂	>250
3-X ₃	125-250	6-X ₃	>250	9-X ₃	>250
		SEC ID 1^a	>250		

a: secuencia 10 métrica original inactiva

- 20 Se identificaron cuatro minilibrerías, que tienen una MIC de 62,5 ug/ml, como más activas que SEC ID NO 1. Estos péptidos se sintetizaron individualmente, a fin de evaluar la actividad de cada secuencia. Las librerías más activas - 2-X₁, 2-X₂, 3-X₁ y 8-X₁ - se abrieron, y se evaluó la contribución de cada resto en cada posición de la secuencia a la actividad antimicrobiana. Además, también se han llevado a cabo modificaciones, tales como la N- y C-acilación y dimerización sobre Lys-β-Ala o Lys-8-Aoa (ácido 8-aminooctanoico), sobre las secuencias más activas aisladas de las minilibrerías. En la Tabla 3, se dan los péptidos que pertenecen a las minilibrerías 2-X₁, y 3-X₁ ensayadas frente a las cepas gramnegativas *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, y frente a la cepa grampositiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las otras dos minilibrerías más activas, denominadas 2-X₂, y 8-X₁, también se abrieron, pero cada péptido ensayado individualmente resultó tener una actividad > 128 ug/ml (datos no mostrados).

Tabla 3. Los péptidos de las minilibrerías se sintetizaron individualmente: se dan las MICs (ug/ml) frente a bacterias gramnegativas y grampositivas

Nombre de la minilibrería	Nombre	Secuencia peptídica	MIC (ug/ml)			
			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
2-X ₁	ID2	H-F-KKIRVRLSA-OH	256	256	512	512
	ID3	H-I-KKIRVRLSA-OH	256	256	512	512
	ID4	H-L-KKIRVRLSA-OH	256	256	512	>512
	ID5	H-V-KKIRVRLSA-OH	512	512	>512	512
	ID6	H-W-KKIRVRLSA-OH	64-128	128	256	512
	ID7	H-Y-KKIRVRLSA-OH	256	256	>512	>512
	3-X ₁	ID8	H-Q-F-KIRVRLSA-OH	128	128	>512
ID9		H-Q-I-KIRVRLSA-OH	512	>512	512	>512
ID10		H-Q-L-KIRVRLSA-OH	128	128	>512	>512
ID11		H-Q-V-KIRVRLSA-OH	256	256	>512	>512
ID12		H-Q-W-KIRVRLSA-OH	64	64	>512	>512
ID13		H-Q-Y-KIRVRLSA-OH	>256	>512	>512	>512
	ID1	H-QKKIRVRLSA-OH	>512	>512	>512	-

- 5 La introducción de ácido piroglutámico o el dipéptido Gly-Gln se puede llevar a cabo en la posición A₁ sin afectar a la actividad del péptido (datos no mostrados). Estas modificaciones evitan la formación de piroglutamato a partir de la ciclación de glutamina N-terminal.

- 10 Se sintetizaron dos péptidos seleccionados (SEC ID NO 6 y 14), aislados de las dos minilibrerías denominadas 2-X₁-W y 3-X₁-W, en forma dimérica (SEC ID NO 18 y 19), a fin de demostrar la mayor actividad relacionada con la polivalencia con respecto a sus contrapartes lineales. El péptido SEC ID NO 14 es un derivado del péptido seleccionado SEC ID NO 12 con una Gly introducida en el término N a fin de evitar la ciclación de Gln. Además, se llevaron a cabo modificaciones tales como la lipídación con ácido 5-aminovalérico (5-Ava) y ácido 8-aminooctanoico (8-Aoa) en el término N (SEC ID NO 16, 17, 21, 22 y 23) y en el término C (SEC ID NO 24) de los péptidos tanto lineal como dimérico, y se ensayaron los productos resultantes.

En la Tabla 4 se dan los valores de MIC de los péptidos lineal y dimérico, y sus lipoderivados.

- 15 Tabla 4. Valores de MIC de péptidos lineales y diméricos y sus lipoderivados

SEC ID N°	Secuencia peptídica	MIC (ug/ml)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
ID6	H-W-KKIRVRLSA-OH	64-128	128	256	512
ID14	H-G-Q-W-KIRVRLSA-OH	64	64	>512	>512
ID1	H-QKKIRVRLSA-OH	>512	>512	>512	-
ID15	H-8-Aoa-W-KKIRVRLSA-NH ₂	32	>64	>64	ND
ID16	H-8-Aoa-Q-W-KIRVRLSA-NH ₂	32	>64	>64	ND
ID17	H-8-Aoa-QKKIRVRLSA-NH ₂	64	>64	>64	ND
ID18	(H-W-KKIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	4	32	32	ND
ID19	(H-G-Q-W-KIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	16	>64	>64	ND
ID20	(H-G-QKKIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	16-32	>64	>64	ND
ID21	(H-5-Ava-W-KKIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	8-16	64	64	ND
ID22	(H-5-Ava-Q-W-KIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	16	>64	>64	ND
ID23	(H-8-Aoa-QKKIRVRLSA) ₂ -Lys-β-Ala-NH ₂	32	>64	>64	ND
ID24	(H-W-KKIRVRLSA) ₂ -Lys-8-Aoa-NH ₂	4	32	ND	ND

ND: no determinado

Los dos compuestos ID18 e ID24 resultaron ser los más activos. Estos compuestos se ensayaron frente a un gran panel de aislados clínicos gramnegativos, y los valores relativos de MIC se dan en la Tabla 5 (partes 1-3).

Tabla 5. Actividad *in vitro* de ID24 e ID18 frente a varios aislados clínicos de bacterias gramnegativas (parte 1)

Microorganismo	Código de la cepa	MIC (µg/ml)	
		ID24	ID18
<i>Acinetobacter baumannii</i> N=3	ND000407	16	16
	ND021408	8	8
	ND021808	8	8
	Intervalo	8-16	8-16
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	ND033508	32	16
<i>Enterobacter cloacae</i> N=4	ND001607	4	4
	ND020808	16	32
	ND029008	16	32
	ND029408	16	16
	Intervalo	4-16	4-32
<i>Klebsiella oxytoca</i> N=2	ND021308	32	32
	ND023408	16	32
	Intervalo	16-32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N=5	ATCC10145,L4	16	16
	ND000207	16	16
	ND010907	8	8
	ND033808	8	8
	ND035408	8	8
	Intervalo	8-16	8-16

Tabla 5. Actividad *in vitro* de ID24 e ID18 frente a varios aislados clínicos de bacterias gramnegativas (parte 2)

Microorganismo	Código de la cepa	MIC (µg/ml)	
		ID24	ID18
<i>Escherichia coli</i> N=28	VECO2526	4	4
	L47	4	8
	ND008007	8	8
	ND020408	32	32
	ND021608	16	32
	ND021708	8	32
	ND022008	4	8
	ND022108	4	8
	ND022308	4	4
	ND022508	4	4
	ND022608	8	8
	ND023008	8	16
	ND023208	4	2
	ND023808	8	8
	ND023908	4	4
	ND027008	8	8
	ND027408	16	16
	ND027608	16	8
	ND027708	8	8
	ND027808	16	16
	ND028408	8	16
	ND028608	8	8
	ND028808	16	16
ND028908	16	32	
ND029208	4	2	
ND029508	4	4	
ND033208	16	16	
ND034008	16	16	
	Intervalo	4-32	2-32
<i>Proteus mirabilis</i> N=9	ND022208	>128	>128
	ND022408	>128	>128
	ND022808	>128	>128
	ND022908	>128	>128
	ND023308	>128	>128

Microorganismo	Código de la cepa	MIC (µg/ml)	
		ID24	ID18
	ND023508	>128	>128
	ND027108	>128	>128
	ND027508	>128	>128
	ND029108	>128	>128
	Intervalo	>128	>128

Tabla 5. Actividad *in vitro* de ID24 e ID18 frente a varios aislados clínicos de bacterias gramnegativas (parte 3)

Microorganismo	Código de la cepa	MIC (µg/ml)	
		ID24	ID18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> N=17	ND003407	4	8
	ND007507	8	8
	ND020308	16	16
	ND020507	16	8
	ND022708	4	8
	ND023608	8	16
	ND023708	16	8
	ND026408	8	8
	ND027208	8	8
	ND027308	8	8
	ND027908	4	8
	ND028008	8	8
	ND028108	16	16
	ND028208	8	4
	ND028308	8	8
ND028508	8	16	
ND028708	8	8	
	Intervalo	4-16	4-16
<i>Serratia marcescens</i>	ND024008	>128	>128
<i>Shigella</i>	ND024108	4	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N=3	ND006507	16	16
	ND021508	32	32
	ND029308	8	8
	Intervalo	8-32	8-32

Efectos *in vitro* de citotoxicidad y hemólisis

5 Citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* de ID24 se ensayó en tres estirpes celulares, usando el ensayo de reducción del colorante MTT. Los valores de CC₅₀ para ID24 se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Citotoxicidad *in vitro* de ID24

Estirpe celular	CC ₅₀ ID24 (ug/ml)	CC ₅₀ ID24 (uM)
HeLa (Estirpe celular de carcinoma epitelial humano)	430	0,156
HepG2 (Estirpe celular de carcinoma de hígado hepatocelular humano)	215	0,078
HaCat (Queratinocito humano)	442,5	0,160

10 Hemólisis *in vitro*

La hemólisis se determinó mediante dos ensayos diferentes, como se describe en el Ejemplo VIII. En las Tablas 7-9 se dan todos los valores en porcentaje de la hemólisis, determinados mediante espectrofotometría de UV-VIS. En particular, en la Tabla 7 se dan los porcentajes de hemólisis de ID24 a diferentes concentraciones y en una relación 1:1 con la suspensión de eritrocitos. Los porcentajes de hemólisis se determinaron mediante espectrofotometría de UV-VIS, determinando la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante leyendo la absorbancia a 414 nm

15

(longitud de onda de referencia 490 nm). Estos resultados se refieren al primer método del Ejemplo VIII, según el protocolo de Shin (Ref. 12).

Tabla 7. Porcentajes de hemólisis de ID24 a diferentes concentraciones en una suspensión de eritrocitos

	Abs media*	Desviación estándar	Hemólisis, %	RSD, %
Triton 1%	0,664	0,006	100,0	0,834
Disolución fisiológica	0,000	0,002	0,0	8,646
ID24 500 ug/ml	0,090	0,008	13,6	7,232
ID24 250 ug/ml	0,078	0,003	11,8	2,756
ID24 125 ug/ml	0,079	0,002	11,9	1,786
ID24 62,5 ug/ml	0,050	0,001	7,6	1,471
ID24 31,2 ug/ml	0,037	0,005	5,6	9,024

*: valor de la absorbancia restado del blanco (disolución fisiológica). Se llevaron a cabo tres mediciones para cada tratamiento.

- 5 En la Tabla 8 se dan los porcentajes de hemólisis de diferentes cantidades de ID24 en una relación 1:1 con sangre completa, mientras que en la Tabla 9 se dan los porcentajes de hemólisis de diferentes cantidades de ID24 en una relación 1:10 con sangre completa. La cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante se determinó leyendo la absorbancia a 560 nm. Estos resultados se refieren al segundo método del Ejemplo VIII.

Tabla 8. Porcentajes de hemólisis de ID24 en una relación 1:1 con sangre completa.

	Abs media*	Desviación estándar	Hemólisis %	RSD %
Saponina (1:1)	1,461	0,030	100	2,003
Disolución fisiológica (1:1)	0,000	0,003	0	5,623
ID24 1 mg/ml	0,006	0,001	0,43	1,903
ID24 500 ug/ml	-0,008	0,004	-0,55	7,580
ID24 250 ug/ml	-0,008	0,002	-0,55	3,297
ID24 125 ug/ml	-0,011	0,002	-0,75	3,525
ID24 62,5 ug/ml	-0,013	0,003	-0,89	7,777

*: valor de la absorbancia restado del blanco (disolución fisiológica). Se llevaron a cabo tres mediciones para cada tratamiento.

10

Tabla 9. Porcentajes de hemólisis de ID24 en una relación 1:10 con sangre completa

	Abs media*	Desviación estándar	Hemólisis %	RSD
Saponina (1:10)	2,139	0,063	100	2,872
Disolución fisiológica (1:10)	0,000	0,005	0	7,588
ID24 (1:10) 500 ug/ml	-0,013	0,003	-0,62	4,992
ID24 (1:10) 250 ug/ml	-0,019	0,002	-0,87	4,845
ID24 (1:10) 125 ug/ml	-0,013	0,006	-0,61	10,986
ID24 (1:10) 62,5 ug/ml	-0,009	0,004	-0,41	6,565

*: valor de la absorbancia restado del blanco (disolución fisiológica). Se llevaron a cabo tres mediciones para cada tratamiento.

Eficacia in vivo en un modelo de septicemia en ratones

- 15 Se administró intravenosamente ID24 a ratones infectados intraperitonealmente con $7,5 \times 10^{12}$ CFU de *E. coli* EC47. En particular, ID24 se administró a una dosis a 15 min. y 6 h después de la infección. Los resultados se muestran en la Fig. 1, que da la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, en la que ID24 se administró dos veces, a una dosis de 3 mg/kg, a 15 min. y 6 horas p.i., mientras que colistin metanosulfonato de sodio (CMS) se administró una sola vez, a 15 min. p.i. a una dosis de 3 mg/kg. Los ratones incluidos en el grupo de control murieron todos hacia el día 3. Cada grupo estaba formado por 8 ratones.
- 20 ID24 demostró que da protección a los ratones frente a la infección provocada por un aislado clínico de *E. coli* (EC47).

Actividad antibiopelícula

La exposición a diferentes concentraciones de ID24 (a 1/4, 1/2, 1, 2 y 4 veces el valor de MIC) dio como resultado una reducción sustancial de la biopelícula bacteriana; en los dos experimentos llevados a cabo, se observó un porcentaje de inhibición que oscila desde 88,7% a 99,9% (de 0,95 a 3,05 log₁₀ de reducción) para todas las concentraciones ensayadas, en comparación con los controles sin tratar. A concentraciones subinhibidoras, se observó de 0,9 a 2,35 log₁₀ de reducción a 1/4 y 1/4 veces el valor de MIC, respectivamente.

Por otra parte, la colistina resultó ser menos activa que ID24; para todas las concentraciones ensayadas, las reducciones de la biopelícula fueron de 88,3% a 97,1% (de 0,88 a 1,55 log₁₀ de CFU/ml de reducción). Los resultados se muestran en las Figuras 2a y 2b.

10 Bibliografía

1. J.N. Chin, M.J. Rybak, C.M. Cheung, y P.B. Savage, "Antimicrobial Activities of Ceragenins against Clinical Isolates of Resistant Staphylococcus aureus" (2007), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4): 1268-1273
2. Y.J. Gordon y E.G. Romanowski, "A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs" (2005), *Current Eye Res.*, 30(7): 505-515.
- 15 3. I.S. Radziszhevsky, S. Rotem, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli, A. Mor, "Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers" (2007), *Nature Biotechnology*, 25: 657-659
4. A.K Marra, W.J. Gooderhama y R.E.W. Hancock, "Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook" (2006), *Current Opinion in Pharmacology*, 6 (5): 468-472.
- 20 5. R.E.W. Hancock y R.I. Lehrer, "Cationic peptides: a new source of antibiotics" (1998), *Trends in Biotechnology*, 16 (2): 82-88
6. R.I. Lehrer y T. Ganz, "Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence" (1999), *Current Opinion in Immunology*, 11: 23-27
7. K. Radek y R. Gallo; "Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system" (2007), *Seminars in Immunopathology*, 29 (1): 27-43
- 25 8. M.G. Scott, H. Yan, y R.E.W. Hancock, "Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides" (1999), *Infections and Immunity*, 67 (4): 2005-2009
9. U.H.N. Durra, U.S. Sudheendraa y A. Ramamoorthy, "LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides" (2006), *Biochimica y Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758 (9): 1408-1425
- 30 10. J.L. del Pozo y R. Patel, "The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections" (2007), *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82: 204-209
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Séptima edición - 2006 - NCCLS documento M7-A7*, NCCLS, Wayne, PA. 2006.
- 35 12. S.Y. Shin, J.H. Kang y K.-S. Hahm, "Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides" (2007), *The Journal of Peptide Research*, 53: 82-90.
13. S. Irwin, "Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse" (1968), *Psychopharmacologica*, 13: 222-257

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto peptídico que tiene una longitud de hasta 35 restos de aminoácidos, que comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula general (Ib):



5 en la que K es un resto de aminoácido con una cadena lateral de lisina, particularmente L- lisina, u otro resto de aminoácido con una cadena lateral cargada positivamente,

I es un resto de aminoácido con una cadena lateral de isoleucina, particularmente L-isoleucina,

R es un resto de aminoácido con una cadena lateral de arginina o una cadena lateral de guanidina *N*-alquil sustituida, particularmente L-arginina,

10 V es un resto de aminoácido con una cadena lateral de valina, particularmente L-valina,

S es un resto de aminoácido con una cadena lateral de serina, particularmente L-serina,

A es un resto de aminoácido con una cadena lateral de alanina, particularmente L-alanina,

L es un resto de aminoácido con una cadena lateral de leucina, particularmente L-leucina,

15 en la que uno de los restos de aminoácidos K, I, R, L, V y S se puede sustituir por un resto de aminoácido con una cadena lateral de alanina, particularmente L-alanina,

Z es el grupo N-terminal del compuesto peptídico, que comprende al menos un resto aminoácido, y se selecciona de

20 (i) un resto de aminoácido aromático o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un resto de aminoácido aromático, en el que el resto de aminoácido aromático se selecciona particularmente de triptófano, *N*-metiltriptófano, fenilalanina, β -fenilalanina, naftilalanina, β -naftilalanina, β -difenilalanina, β -(4,4'-bifenil)alanina, β -antracen-9-ilalanina y β -indol-3-ilalanina, o sus derivados sustituidos,

25 (ii) un resto de aminoácido alifático o un grupo di-, tri- o tetrapeptídico que comprende al menos un resto de aminoácido alifático, en el que el resto alifático es un resto de α -aminoácido que comprende una cadena lateral alifática ramificada de al menos 3 átomos de carbono,

(iii) combinaciones de uno cualquiera de (i)-(ii),

y n es 0 ó 1,

y en el que el compuesto peptídico puede comprender bloques de construcción de restos de L- y/o D-aminoácidos.

30 2. El compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que el grupo Z N-terminal se selecciona de Ar, Ar-Q, Q*-Ar tal como G-Q-Ar o acetilo-Q-Ar, pyrE y pyrE-Ar, en los que Ar es un resto de aminoácido aromático.

3. El compuesto peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

WKKIRVRLSA (SEC ID NO: 6)

pyrEWKIRVRLSA (SEC ID NO: 27)

35 GQWKIRVRLSA (SEC ID NO: 14)

Acetil-QWKIRVRLSA (SEC ID NO: 12)

Aoa-QWKIRVRLSA (SEC ID NO: 16)

(GQWKIRVRLSA)₂ K- β -Ala (SEC ID NO: 19)

40 en las que pyrE es un resto de ácido piroglutámico, Aoa es un resto de ácido 8-aminooctanoico, β -Ala es un resto de β -alanina, y en los que los péptidos anteriores están opcionalmente amidados en sus términos C.

4. Un compuesto peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene una longitud de hasta 15 restos de aminoácidos.

5. Un compuesto peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que tiene una forma lineal o cíclica.

6. Un compuesto multimérico que comprende una pluralidad de compuestos peptídicos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

5 7. El compuesto multimérico de la reivindicación 6, que está multimerizado en una matriz, particularmente seleccionada de poli(*N*-alquil(met)acrilamida), poli(*N,N*-dialquil(met)acrilamida), polimelamina, dextrano, ciclodextrina, polietilenglicol y/o polivinilpirrolidona.

8. El compuesto multimérico de la reivindicación 6, que tiene una estructura ramificada, particularmente una estructura dendrítica.

9. El compuesto multimérico de la reivindicación 6 ó 7, que se selecciona de:



10 en el que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

Y^1 es un enlace covalente o un ligador bifuncional, por ejemplo un dialcohol tal como propilenglicol, un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, una diamina tal como etilendiamina, un aminoácido, un ácido hidroxicarboxílico, o un diisocianato, y m es 0 o un número entero positivo, y m^1 es 0 ó 1,



15 en la que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

Y^1 es, en cada caso, independientemente, un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 3, por ejemplo un aminoácido trifuncional tal como lisina, ornitina, norlisina, aminoalanina, ácido aspártico o ácido glutámico, e

Y^2 es un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 2, y

20 n_1 y n_2 son, en cada caso, independientemente, un número entero de al menos 2, preferiblemente 2, 3 ó 4, más preferiblemente 2,



en la que R es un compuesto peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

Y^1 e Y^2 son, en cada caso, ligadores independientes que tienen una funcionalidad de al menos 3, por ejemplo un aminoácido trifuncional tal como lisina, ornitina, norlisina, aminoalanina, ácido aspártico o ácido glutámico,

25 Y^3 es un ligador que tiene una funcionalidad de al menos 2, y

n_1 , n_2 y n_3 son, en cada caso, independientemente, números enteros de al menos 2, preferiblemente 2, 3 ó 4, más preferiblemente 2.

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende al menos una modificación, particularmente seleccionada de un resto lipídico, amídico, de éster, acílico y/o alquílico unido al mismo.

30 11. El compuesto de la reivindicación 10, que comprende al menos un resto lipídico, que es al menos un ácido aminocarboxílico que comprende un grupo hidrocarbonado lineal o cíclico, saturado o mono- o poliinsaturado que tiene 3 a 25 átomos de carbono, por ejemplo ácido 5-aminovalérico, ácido 8-aminooctanoico o ácido 2-aminodecanoico, y que está unido preferiblemente al término N y/o C del compuesto.

35 12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que tiene actividad frente a organismos patógenos seleccionados de organismos procariontas, por ejemplo eubacterias o arqueas, y organismos eucariotas, por ejemplo hongos, algas o parásitos.

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que tiene actividad antibacteriana.

14. Una composición para uso médico, que comprende al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

40 15. La composición de la reivindicación 14, en forma de una forma de dosificación farmacéutica, seleccionada de sólidos, líquidos o geles, y sus combinaciones, por ejemplo como un colirio, colutorio, ungüento, aerosol o producto tópico.

16. Una composición para uso como un desinfectante y/o detergente, que comprende al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

45 17. Una composición para uso como un conservante, que comprende al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

18. El composición de la reivindicación 17, como conservante para productos médicos, cosméticos o alimentarios.

19. El compuesto de la reivindicación 17, para disminuir el crecimiento o proliferación de microorganismos embebidos en una biopelícula.

5 20. Una composición veterinaria que comprende al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

Figura 1

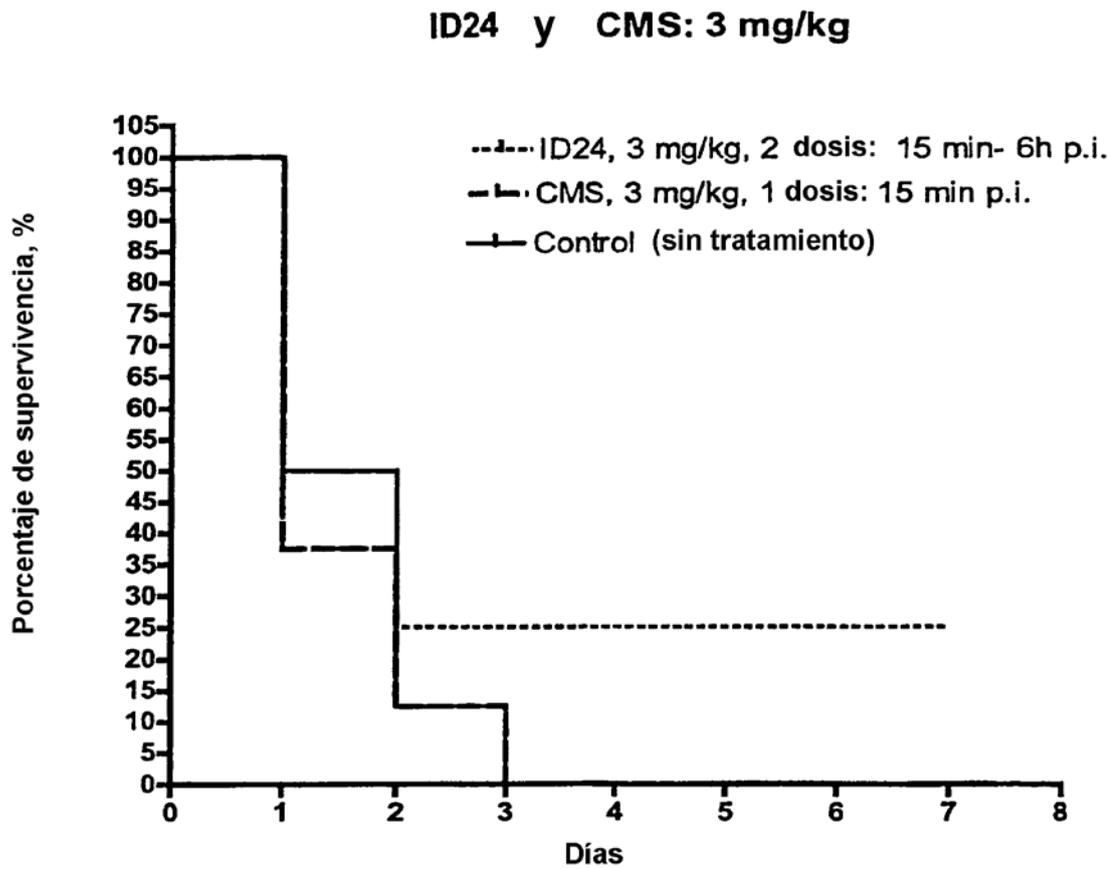


Figura 2a

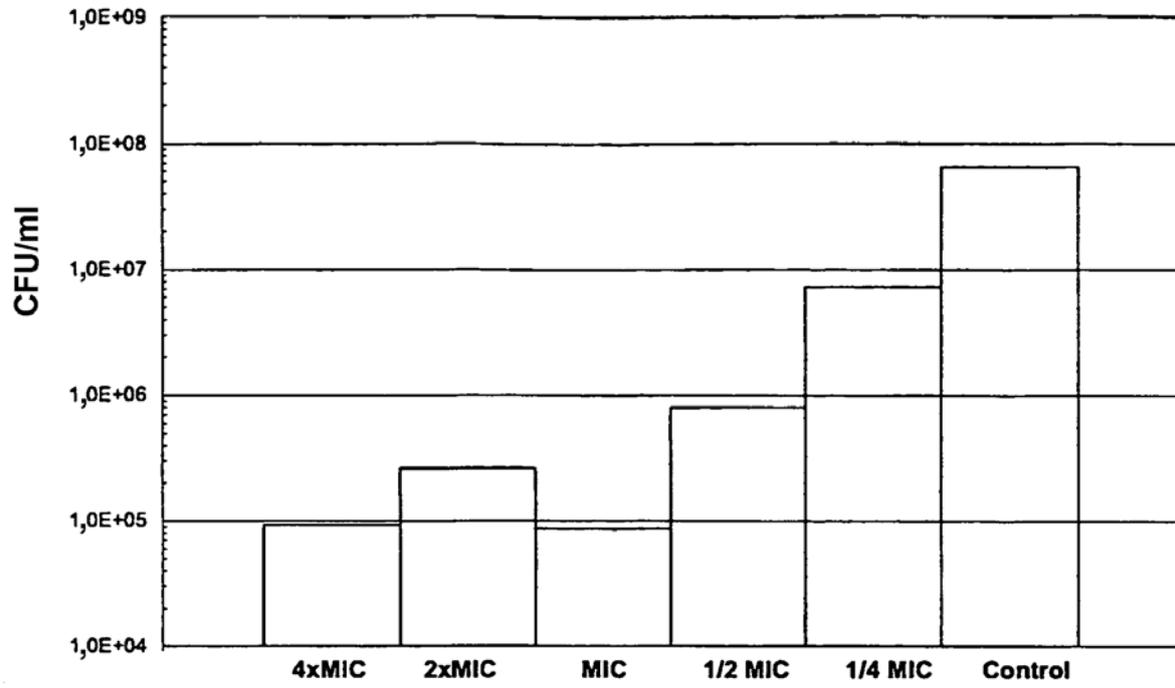


Figura 2b

